

VALORIZAÇÃO DOS RECURSOS MARINHOS:
Biomateriais em Regeneração de
Tecidos e Libertação de Fármacos

VALORIZACIÓN DE RECURSOS MARINOS:
Biomateriales en Regeneración de
Tejidos y Liberación
de Fármacos

Coordenadores/Coordinadores:

Carmen González Sotelo

Pilar Sieiro Piñeiro

Julio Maroto Leal

José A. Vázquez

Ricardo I. Pérez Martín

Tiago H. Silva

Rui L. Reis



Colagénio Marinho: valorização de subprodutos marinhos com vista à regeneração de tecidos

Ana L. P. Marques^{1,2}, Carmen G. Sotelo³, Gabriela S. Diogo^{1,2}, Joana Moreira-Silva^{1,2}, María Blanco³, Tiago H. Silva^{1,2*}, Ricardo I. Pérez-Martín³, Rui L. Reis^{1,2}

¹ 3B's Research Group - Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, University of Minho, Headquarters of the European Institute of Excellence on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, AvePark, 4805-017 Barco, Guimarães, Portugal.

² ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.

³ Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, España.

*tiago.silva@dep.uminho.pt; carmen@iim.csic.es

Resumo

Colagénio é o grupo de proteínas mais abundantes nos organismos vertebrados e invertebrados, incluindo mamíferos, possuindo um papel fundamentalmente estrutural. Existem, descobertos até agora, 28 tipos de colagénio, cada um com uma organização específica em diferentes tecidos, como osso, tendão, cartilagem, pele ou córnea. Tendo um papel tão determinante nos tecidos biológicos, é um dos materiais mais utilizados em engenharia de tecidos: consoante o tecido que se quer regenerar é escolhido o tipo de colagénio a utilizar. Sendo já usado em diversas indústrias, como farmacêutica, alimentar ou cosmética, a principal fonte é de origem bovina ou suína. No entanto, devido ao risco de transmissão de doenças ou fatores religiosos, os organismos marinhos têm adquirido especial atenção. É possível isolar colagénio de peles de peixes e utilizá-lo em diversas áreas. Neste capítulo damos ênfase ao processo de extração de colagénio tipo I e algumas aplicações na área da engenharia de tecidos, nomeadamente na produção de membranas, hidrogéis e compósitos, com aplicação em libertação controlada de fármacos e regeneração de tecidos biológicos.

1. Introdução

O colagénio constitui uma das principais proteínas estruturais dos metazoários, estando presente em diversas estruturas destes organismos, como o tecido conjuntivo, estruturas ósseas e cartilaginosas, pele, etc. (Shigeru e Masataka, 1999). Esta proteína é um dos constituintes de macroestruturas e tecidos onde é necessária alguma resistência, formando uma rede onde inúmeras moléculas estão ligadas de diversos modos. No caso de estruturas como os tendões ou ossos, as unidades de colagénio alinham-se, formando fibrilas, que por sua vez se associam longitudinalmente (Figura 1), dotando as estruturas de grande resistência e capacidade de suportar tensão. No caso do osso e cartilagem, as fibras de colagénio acomodam-se formando uma rede que permite a disposição de outras biomoléculas e compostos inorgânicos.

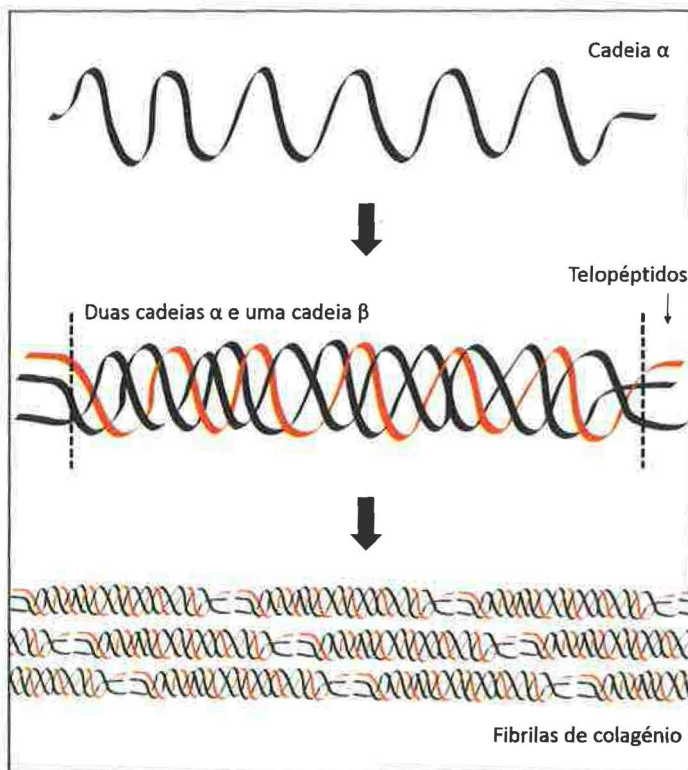


Figura 1. Organização estrutural das moléculas de colagénio: em cadeias polipeptídicas, estas em tripla hélice e estas últimas em fibrilas.

Existem 28 tipos de colagénio, conhecidos até agora, que apresentam pequenas diferenças a nível da sua estrutura primária ou quaternária, conferindo às fibras resultantes diferentes características estruturais (Ricard-Blum, 2011).

Em geral, os diferentes tipos de colagénio apresentam uma estrutura quaternária composta por três subunidades alfa que, dependendo do tipo de colagénio, podem apresentar pequenas diferenças tanto a nível de peso molecular como da sua composição de aminoácidos (Bailey e col., 1998). Estas cadeias alfa são constituídas por uma hélice alfa levogira que se dispõem formando uma super-hélice dextrogira, e que se estabiliza consoante a existência de ligações covalentes entre as cadeias (Benjakul e col., 2012).

O tipo de colagénio mais estudado no caso das espécies marinhas é o colagénio tipo I, caracterizando-se pela presença de dois tipos de cadeias alfa (α), cada uma com um peso molecular de cerca de 100 kDa e uma cadeia beta (β) (Gómez-Guillén e col., 2002, Singh e col., 2011, Sotelo e col., *submetido*) (Figura 2).

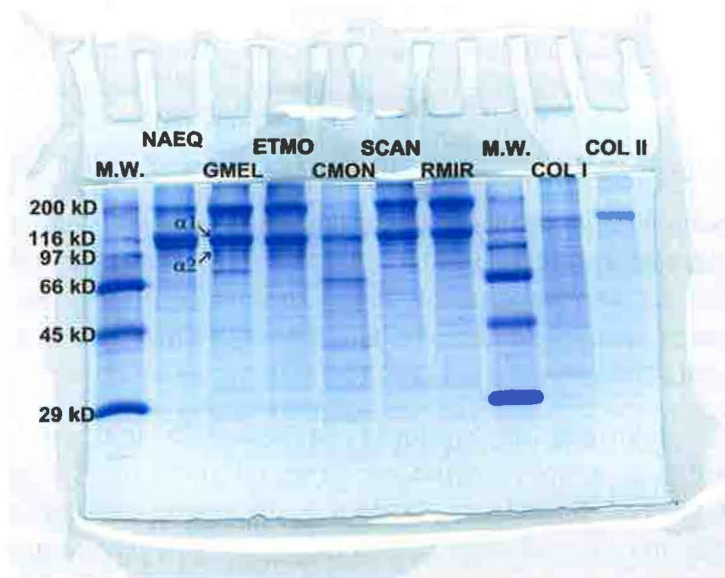


Figura 2. SDS-PAGE de colagénio solúvel em ácido extraído da pele de teleósteos e condríctes. MW: Peso molecular padrão; NAEQ: *Nezumia aequalis*; GMEL: *Galeus melanostictus*; ETMO: *Etmopterus spp.*; CMON: *Chimaera monstrosa*; SCAN: *Scyliorhinus canicula*; RMIR: *Raja miraletus*; COL I: colagénio tipo I bovino, COL II: colagénio tipo II bovino.



As propriedades do colagénio, como em qualquer proteína, são determinadas pela sua composição de aminoácidos. Esta proteína tem uma composição particular, uma vez que grande parte das subunidades alfa se caracteriza pela repetição da sequência X-Y-Gly, pelo que o aminoácido Glicina (Gly) constitui aproximadamente 1/3 do total de aminoácidos desta proteína (Horng e col., 2007). Outra característica importante é a presença de aminoácidos em que o azoto da amina está ligado não apenas a um mas a dois carbonos num anel cíclico (anteriormente conhecidos como iminoácidos), como a prolina e a hidroxiprolina, que explica algumas características físico-químicas do colagénio e que podem ser fundamentais na estabilidade da sua tripla hélice (Jongjareonrak e col., 2010). O conteúdo destes aminoácidos na pele de peixes encontra-se entre 150 e 170 resíduos/1000, valores inferiores aos encontrados em colagénio de mamíferos (Regenstein e Zhou, 2006).

Outras propriedades, como a capacidade de gelificação ou a viscosidade, dependem também da composição de prolina, hidroxiprolina e outros aminoácidos. A temperatura de fusão do colagénio e gelatinas de mamíferos encontra-se entre os 30 °C e os 33 °C, enquanto para peixes de água quente pode oscilar entre os 23 °C e 29 °C (Hwang e col., 2007). Sotelo e colegas sugerem a existência de uma correlação positiva entre a percentagem de hidroxilação da prolina presente no colagénio solúvel em ácido (ASC, do inglês *Acid Soluble Collagen*), da pele de distintas peles de peixe, com a temperatura de desnaturação do colagénio (Sotelo e col., *submetido*).

O colagénio tem diversas aplicações industriais, sendo que as mais conhecidas se encontram no âmbito da indústria alimentar e cosmética (Li e col., 2005, Gómez-Guillén e col., 2011, Hashim e col., 2015), existindo já um campo de aplicação emergente relativamente a materiais biomédicos (Nagai e col., 2004, Hoyer e col., 2012).

As atuais indústrias de produção de colagénio utilizam resíduos provenientes do processamento de carne, tal como peles e ossos de suínos e bovinos. No entanto, desde o aparecimento de doenças como a encefalopatia espongiforme bovina (BSE, do inglês *bovine spongiform encephalopathy*) derivadas do consumo de animais de criação que contém príões causadores da doença, a utilização destas fontes é vista com alguma apreensão. Por outro lado, a quantidade de subprodutos originários da indústria pesqueira é significativa, alcançando valores



de até 55% do total do peso do produto a processar, dos quais 30% poderiam servir como matéria-prima para a obtenção de compostos com grande valor acrescentado como o colagénio marinho, incluindo pele, espinhas e escamas (Gómez-Guillén e col., 2002, Kittiphattanabawon e col., 2010a,b). No entanto, na maioria das indústrias de processamento, a gestão e o tratamento destes subprodutos representam um problema sendo utilizados, no melhor dos casos, como matéria-prima para o fabrico de farinhas de peixe ou fertilizantes (Nagai e Suzuki, 2000).

No caso concreto da Galiza, em Espanha, onde se concentra uma boa parte do sector pesqueiro espanhol, os principais geradores de subprodutos de peixe são as indústrias de transformação e elaboração de produtos da pesca (incluindo aqui as conservas), os mercados e exportadores de peixe, plantas de aquicultura e barcos de pesca. Ter uma estimativa dos subprodutos gerados por cada um destes intervenientes na cadeia de valor é bastante difícil, em parte devido à dispersão e fragmentação dos próprios operadores, não existindo estatísticas fiáveis a esse respeito. Os autores deste trabalho têm recorrido a entrevistas diretas, obtendo informações ao longo dos últimos cinco anos e, de entre as principais conclusões, realça-se uma significativa acumulação de matéria-prima na Galiza e em Portugal, que poderia sustentar uma possível indústria de produção de colagénio e gelatina de espécies de origem marinha. Como exemplo, só no mercado de Vigo durante o ano 2012, foi recolhida aproximadamente 1 tonelada de peles de peixe de diversas espécies. No caso de Portugal, cuja indústria do processamento de pescado é inferior à espanhola, a acumulação de subprodutos pode chegar a atingir 7000 toneladas anuais, das quais é difícil diferenciar os tipos de subprodutos. Mas, se estimarmos que cerca de 10% desses subprodutos são peles, teríamos uma quantidade de 70 toneladas de matéria-prima para a obtenção destas duas proteínas de origem marinha. Outra importante fonte de colagénio e gelatina é representada pelos descartes das espécies marinhas sujeitas a cotas ou TACs (do inglês *Total Allowable Captures*) os quais, após a entrada em vigor da atual Diretiva Europeia (Regulamento UE nº 1380, 2013), devem ser desembarcados obrigatoriamente. Este novo regulamento é um desafio para o sector das pescas, uma vez que é necessário encontrar alternativas viáveis de valorização para os produtos a descartar, para amortecer o impacto económico envolvido em trazer para terra uma captura que, até ao momento, carece de valor comercial.



Uma das alternativas que temos vindo a defender é a extração de colagénio e gelatinas e sua utilização em sectores de maior valor acrescentado, nomeadamente o biomédico. É essa abordagem que exploramos nas secções seguintes.

2. Extração de colagénio de fontes marinhas

No processo de extração de colagénio de recursos marinhos, as variáveis que podem afetar o rendimento e propriedades do colagénio extraído incluem os próprios materiais, os tipos de reagentes utilizados e a sua concentração, o tempo de reação e a temperatura a que são realizadas as etapas do processo (Regenstein e Zhou, 2006). De um modo geral, a metodologia de extração consta de uma primeira etapa de eliminação de impurezas e de outros componentes que podem estar presentes no material a utilizar, nomeadamente outras proteínas distintas do colagénio, lípidos, pigmentos, cálcio e outros componentes inorgânicos, sendo este um passo que permite um incremento da pureza do colagénio extraído. Com esta finalidade, diversos autores recorrem ao tratamento alcalino utilizando geralmente hidróxido de sódio (NaOH) 0'1M (Nam e col., 2008, Benjakul e col., 2010, Matmaroh e col., 2011, Liu e col., 2012, Sotelo e col., *submetido*), sendo menos utilizado o cloreto de sódio (NaCl) por ser menos eficaz na eliminação de albuminas e globulinas, assim como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Sadowska e col., 2003, Wang e col., 2007, Zhang e col., 2009). No entanto, o NaCl é utilizado em concentrações mais elevadas para a precipitação do colagénio extraído, num passo posterior (Nagai e Suzuki, 2000). Quando a matéria-prima contém grandes quantidades de cálcio, como no caso de espinhas e escamas, recorre-se ao uso de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou outros ácidos orgânicos, para a descalcificação das amostras (Kittiphattanabawon e col., 2005). O uso de álcool (álcool butílico ou etílico) é indicado para a remoção de gorduras e pigmentos presentes na matéria-prima (Nagai e col., 2002, Senaratne e col., 2006). A fim de facilitar a eliminação dos componentes referidos anteriormente e melhorar a extração de colagénio, é recomendável a redução do tamanho das amostras a utilizar, por trituração e/ou moagem.

No procedimento principal para o isolamento de colagénio é utilizado um meio de extração de carácter ácido, no qual o colagénio se solubiliza, obtendo-se ASC. Em simultâneo, ou num passo seguinte, pode utilizar-se



uma enzima, pepsina, para facilitar a solubilização do restante colagénio no referido meio, obtendo-se PSC (do inglês, *Pepsin Soluble Collagen*). O ácido acético é o mais utilizado neste tipo de extração, conseguindo-se um efeito de repulsão entre as moléculas de colagénio devido à carga positiva adquirida pelas cadeias polipeptídicas que formam o colagénio, ajudando na sua solubilização (Benjakul e col., 2012). O rendimento da extração, determinado geralmente em função do conteúdo de hidroxiprolina (por ser considerado um aminoácido específico do colagénio), varia em função da espécie, idade, estado da matéria-prima e do protocolo e condições de extração (Sikorski, 1994, Foegeding e col., 1996, Badii e Howell, 2003, Nalinanon e col., 2007, Zelechowska e col., 2010). Vários autores realizaram a extração de colagénio de distintas espécies marinhas utilizando 0'5M ácido acético a 4 °C durante 24-48h (Matmaroh e col., 2011), mostrando, em algumas ocasiões, uma relação direta entre um maior rendimento de colagénio e incrementos na concentração de ácido acético utilizado (Benjakul e col., 2012) ou maior tempo de reação (Nalinanon e col., 2007). Os rendimentos obtidos mediante a solubilização do colagénio em ácido são frequentemente baixos e, por este motivo, recorre-se ao uso de pepsina. Esta enzima hidrolisa especificamente os péptidos nas regiões não helicoidais da molécula, denominadas telopéptidos, aumentando assim a eficiência na extração (Nalinanon e col., 2007, Kittiphattanabawon e col., 2010a). As vantagens do uso de pepsina no procedimento de extração do colagénio incluem a eliminação de proteínas não colagenosas (devido à ação hidrolítica da pepsina) (Kittiphattanabawon e col., 2010b), aumento do rendimento da extração em ácido (Singh e col., 2011) e redução da antigenicidade associada aos telopéptidos (Lynn e col., 2004), aumentando assim a possibilidade de incorporação deste colagénio em produtos alimentares e em diferentes aplicações biomédicas (Lynn e col., 2004).

3. Aplicações biomédicas de colagénio

3.1. Membranas para libertação controlada de fármacos

3.1.1. Sistemas de libertação controlada

O método de administração de um composto farmacêutico num determinado local e com uma taxa de libertação específica é comumente



designado de *libertação controlada* de um fármaco. O número de estudos sobre este tópico tem vindo a crescer nas últimas décadas, na tentativa da obtenção de sistemas com as características desejadas para determinado fim. Esta tornou-se numa área multidisciplinar, envolvendo conhecimentos dos campos da química, física, biologia, conceitos de biofarmacêutica, fármaco-cinética e, com o desenvolvimento de novas técnicas de processamento de polímeros, bioengenharia (Ranade e col., 2003).

Os sistemas de libertação têm evoluído de modo a maximizar a sua eficácia terapêutica (Ranade e col., 2003). Existem diversos tipos de sistemas, como hidrogéis, nano/micro cápsulas, nano/micro esferas, lipossomas, micelas, dendrímeros e também nanotubos de carbono, demonstrando propriedades atrativas tendo em vista a libertação de fármacos. Também membranas produzidas por eletrospinning (*electrospinning*) ou por moldação por evaporação de solvente (*solvent casting*) podem ser utilizadas neste sentido. Alguns destes sistemas têm como base materiais poliméricos, podendo estes ser tanto naturais como sintéticos.

Os sistemas para libertação de fármacos, quer sejam de origem natural ou sintética, devem compreender requerimentos importantes de modo a evitar efeitos nefastos para o organismo (Chasin e Langer, 1990), nomeadamente:

- mínimo de efeito biológico secundário possível após inserção;
- o material constituinte deverá ser biodegradável e tanto o primeiro como os compostos resultantes da degradação deverão ser biocompatíveis e/ou facilmente excretados pelo organismo;
- ausência de impurezas ou produtos químicos utilizados na sua preparação (como agentes de reticulação).

Estes sistemas são dotados de algumas funcionalidades cujos métodos tradicionais não conseguem acompanhar (Ranade e col., 2003), particularmente:

- acesso a locais inacessíveis por vias cirúrgicas;
- especificidade do local de libertação;
- entrega da quantidade desejada de fármaco;

- capacidade de controlo da taxa de libertação.

Os sistemas que consigam reunir estas propriedades são desejáveis, conseguindo ultrapassar algumas das lacunas existentes nos métodos atuais.

3.1.2. Diferentes tipos de sistemas de libertação de fármacos

Os sistemas de libertação de fármacos podem ser diferenciados em 4 grupos (Chasin e Langer, 1990, Ranade e col., 2003):

Sistemas de libertação controlados por difusão

Estes sistemas podem ser de dois tipos: matrizes ou reservatórios. Nos primeiros, o fármaco estará uniformemente distribuído ao longo da matriz, sendo libertado a uma taxa uniforme. No segundo caso, o reservatório é, normalmente, de forma esférica ou cilíndrica, contendo o fármaco no seu interior numa solução líquida ou em pó. São as propriedades do conjunto polímero/fármaco que definem a difusão e a taxa de libertação. No entanto, este tipo de sistema levanta preocupações específicas: remoção dos reservatórios do organismo após finalizada a libertação do fármaco ou possibilidade de rotura do sistema e consequente libertação de doses muito elevadas do fármaco para o organismo (Figura 3).

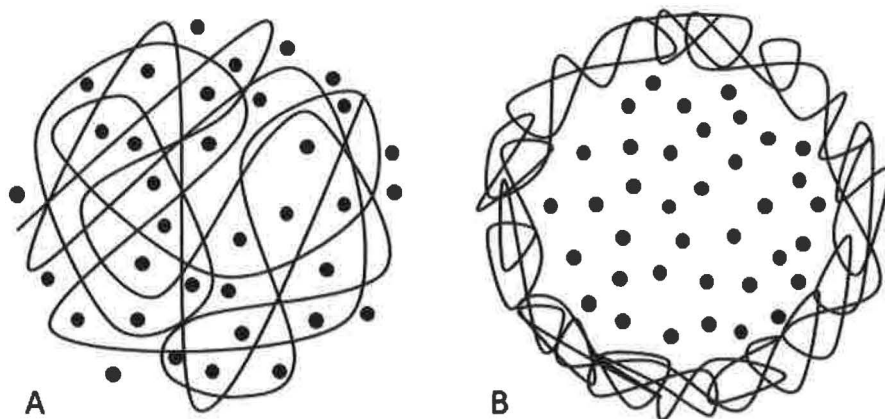


Figura 3. Modelos esquemáticos de sistemas de libertação controlados por difusão: A) Sistema matricial; B) Sistema de reservatório.

Sistemas de libertação ativados por solvente

Estes poderão ser de dois tipos: controlados osmoticamente ou com sistema de inchamento/expansão. Os primeiros são constituídos por um núcleo, que contém o fármaco, sendo este revestido por uma membrana semi-permeável à água que tem um pequeno orifício. Havendo, no interior da membrana, um agente osmótico que estimula a entrada de água através da mesma, ocorre um aumento de volume da membrana para o interior forçando o fármaco a sair através do orifício (Figura 4). Nos sistemas de inchamento é utilizado um polímero hidrofílico reticulado que consegue absorver grandes quantidades de água sem que ocorra a sua dissolução. A taxa de libertação do fármaco é proporcional à entrada de água e consequente expansão das cadeias macromoleculares (Figura 5).

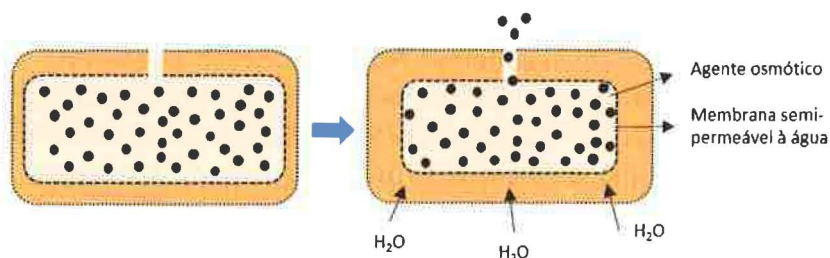


Figura 4. Modelo esquemático de sistema de libertação de fármacos ativado por solvente: controlado osmoticamente. Javad Shokri and Khosro Adibkia (2013). Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries, Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications, Dr. Theo G.M. Van De Ven (Ed.), ISBN: 978-953-51-1191-7, InTech, DOI: 10.5772/55178. Available from: <http://www.intechopen.com/books/cellulose-medical-pharmaceutical-and-electronic-applications/application-of-cellulose-and-cellulose-derivatives-in-pharmaceutical-industries>

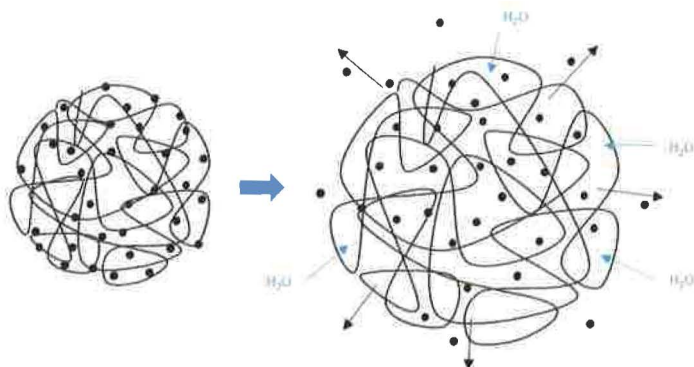


Figura 5. Modelo esquemático de sistema de libertação de fármaco controlado por expansão.

Sistemas de liberação controlados por ação química

Estes sistemas podem ser divididos em dois tipos: sistemas biodegradáveis e sistemas de “cadeias pendentes”. Nos primeiros, sistemas biodegradáveis, tal como o nome indica, o polímero é biodegradável e com a sua degradação ocorre a liberação do fármaco que se encontra disperso ou dissolvido na matriz (Figura 6). Nos sistemas de cadeias pendentes o fármaco encontra-se quimicamente ligado ao polímero. Por ação enzimática ou hidrólise essa ligação é quebrada, ocorrendo liberação do fármaco.

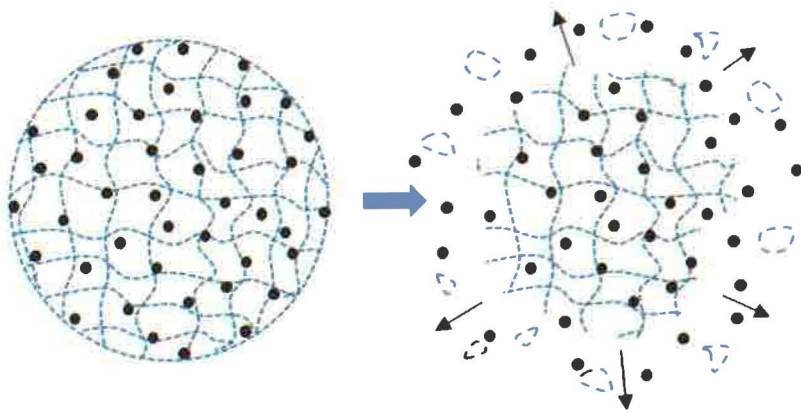


Figura 6. Modelo esquemático de sistema biodegradável de liberação de fármacos.

Sistemas controlados magneticamente

São sistemas de liberação de microesferas magnéticas e albumina que foram desenvolvidos para atuarem especificamente em tumores. Teoricamente, sendo estas partículas magnéticas, tornam mais fácil e precisa a sua localização: serão, assim, mais eficientes em relação ao local selecionado para liberação do fármaco.

3.1.3. Biomateriais em liberação controlada

Diversos polímeros podem ser utilizados em sistemas de liberação de fármacos, tanto naturais como sintéticos, podendo-se selecionar um ou mais para o mesmo sistema. Os polímeros sintéticos oferecem composição controlada, reprodutibilidade e degradação passível de ser ajustada. Consistem essencialmente em poli-hidroxiácidos e ésteres, como o

ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático-co-glicólico (PLGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Os polímeros naturais como o colagénio, alginato ou quitosano são também amplamente utilizados por possuírem normalmente uma elevada taxa de biocompatibilidade (Uchegbu e Schatzlein, 2006).

O colagénio é um biomaterial natural com excelentes propriedades, sendo biocompatível, biodegradável e com baixa antigenicidade, tornando-se numa escolha lógica para uso em engenharia de tecidos (Uchegbu e Schatzlein, 2006). É utilizado em diversas aplicações, singularmente ou em compósitos, em *scaffolds*, membranas ou partículas, e em diferentes áreas como indústria cosmética, alimentar ou farmacêutica. Os diversos tipos de colagénio estão distribuídos por diferentes estruturas do corpo, sendo o colagénio tipo I o mais abundante, presente em tecidos como a pele, osso ou tendão.

São comumente utilizadas fontes bovinas ou porcinas para obtenção desta proteína. No entanto, uma nova fonte tem vindo a captar as atenções da comunidade científica. O colagénio marinho, obtido de subprodutos da indústria alimentar, como peles de peixe, é cada vez mais procurado, tal como referido anteriormente, apresentando propriedades que se assemelham às do colagénio bovino ou porcino.

3.1.4. Membranas de colagénio de tubarão para libertação controlada

A matriz extracelular tem como principais constituintes o colagénio, juntamente com glicoproteínas e proteoglicanos, sendo de importância crucial para a morfogénese, estrutura e função dos tecidos vivos (Song e col., 2006). A escolha do(s) polímero(s) para a produção de sistemas análogos à matriz extracelular, numa lógica de engenharia de tecidos, é de extrema importância, pois irá afetar as propriedades (físicas, químicas e biológicas) da matriz produzida. Neste sentido o colagénio é apontado como um dos polímeros que mais se adequa à produção de membranas ou *scaffolds* para substituição da matriz extracelular.

Técnicas como *electrospinning* ou *solvent casting* permitem a incorporação de um fármaco aquando do desenvolvimento de membranas. Num estudo realizado pelos autores deste capítulo, extraíu-se colagénio tipo I de peles de tubarão pata-roxa (*Scyliorhinus canicula*), que foi utilizado para a

produção de membranas por *solvent casting*, com dexametasona dispersa por toda a sua extensão. A dexametasona é um fármaco esteróide com propriedade anti-inflamatória, podendo ser incorporada em diversos sistemas poliméricos, nomeadamente membranas de colagénio, para serem utilizadas em tratamentos de feridas de pele.

Nesse trabalho prepararam-se membranas de colagénio a partir de uma solução de colagénio a 1% em ácido acético 0'5 M, depositada em moldes apropriados e deixando o solvente evaporar, resultando em membranas com a forma pretendida (Figura 7).

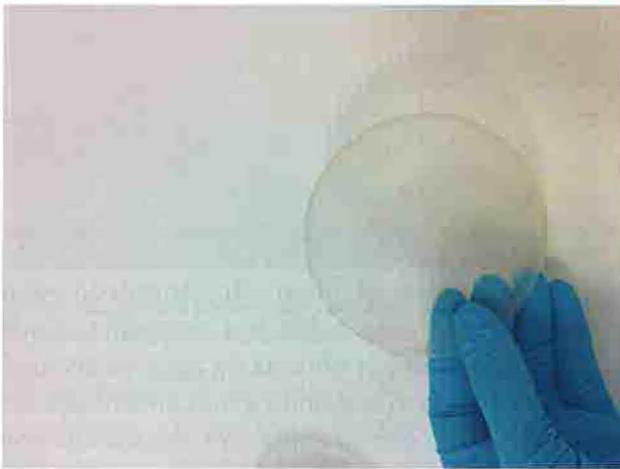


Figura 7. Membrana de colagénio de tubarão, obtida por *solvent casting*.

Para estabilizar a estrutura da membrana e impedir a sua rápida dissolução em água, testou-se a influência de um reticulante – hexametileno diisocianato (HMDI), em proporções de 1% e 5% relativamente ao colagénio, avaliando diferentes tempos de reação. A influência do reticulante na hidrofiliidade das membranas foi demonstrada pela química da sua superfície, nomeadamente pela quantificação dos grupos amina livres: com uma maior quantidade de HMDI e um maior tempo de reação, existem menos grupos amina livres (a reação de reticulação faz-se através destes grupos), resultando numa diminuição da hidrofiliidade da membrana.

Relativamente aos estudos com o fármaco modelo, dexametasona, este foi incorporado na membrana durante a sua preparação, dissolvido previamente em acetona e adicionando-o à solução de colagénio. As membranas com maior grau de reticulação mostraram ser aquelas cuja

taxa de libertação do fármaco foi mais baixa. No entanto, em todos os casos, cerca de 8 horas após o início da libertação do fármaco, foi atingida uma situação de equilíbrio (Figura 8).

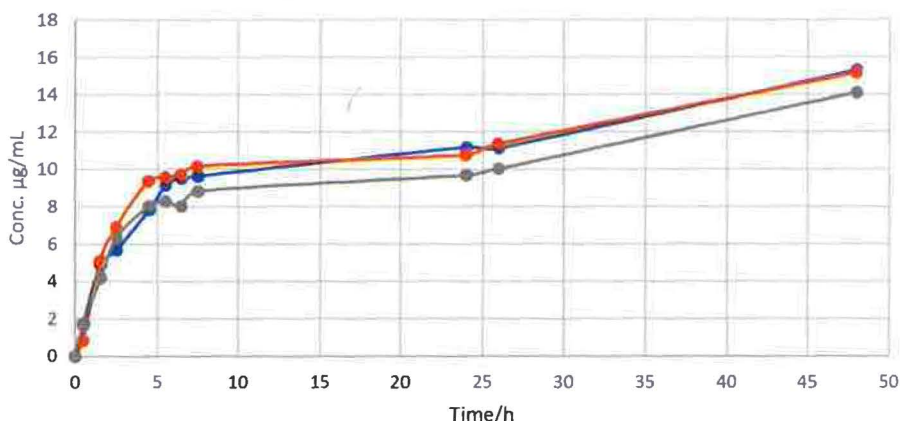


Figura 8. Perfil de libertação de dexametasona por membranas de colagénio de tubarão.

Trata-se, assim, de um sistema de libertação controlado por difusão, pois embora a membrana seja constituída por colagénio, biodegradável, a libertação do fármaco ocorre por entrada de água no sistema e posterior mobilidade do fármaco para o local onde a sua concentração era menor – o exterior da membrana – até que se atinja uma situação de equilíbrio.

3.2. Hidrogéis

Os hidrogéis têm vindo a receber uma grande atenção por parte da comunidade científica, tendo em conta as suas potenciais aplicações em medicina regenerativa, como estruturas que proporcionam integridade aos tecidos. Podem ter como objetivo a libertação controlada de fármacos e proteínas, servindo também como adesivos ou de sistema protetor de material encapsulado (células, compostos bioativos, etc.) (Slaughter e col., 2009).

Colagénio tipo I extraído de peles do tubarão *Scyliorhinus canícula*, utilizando ácido acético 0'5 M (Fernandes-Silva e col., 2013), foi utilizado na preparação de estruturas porosas através da tecnologia de liofilização. Estas estruturas foram posteriormente reticuladas com genipina (um reticulante natural que se tem mostrado eficaz, além de apresentar baixa

toxicidade), proporcionando-lhes estabilidade. Quando a reticulação é realizada através de CO_2 denso a 54 bar e à temperatura ambiente durante 16h, obtém-se um hidrogel poroso (Figura 9).

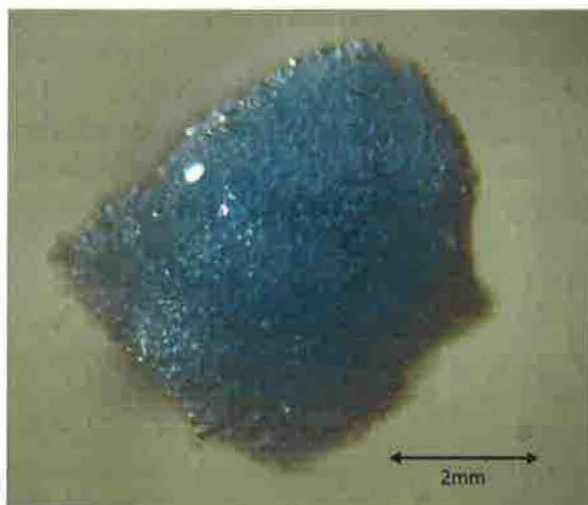


Figura 9. Hidrogel de colagénio marinho tipo I reticulado com genipina 0'1%, à temperatura ambiente, em CO_2 pressurizado a 54 bar, durante 16 horas.

Foi avaliado o seu potencial para utilização em engenharia de tecidos e medicina regenerativa, em particular para a regeneração da cartilagem. Estes hidrogéis porosos apresentam propriedades mecânicas adequadas à aplicação prevista, com um aumento do módulo de compressão da estrutura de 46'3 kPa para 57'3 kPa com a reticulação a 25% (relativamente às aminas livres). A morfologia das estruturas reticuladas foi caracterizada através de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e microtomografia computadorizada de Raios-X (μ -CT), apresentando um tamanho médio de poro de 98 μm , com uma porosidade de 79% e interconectividade de 76%. No que diz respeito à avaliação do seu desempenho biológico, foram colocadas células ATDC5 (linha celular de condrócitos) em contacto direto com as estruturas de colagénio reticuladas, mostrando um aumento de atividade metabólica das células, assim como um aumento de dsDNA ao longo do tempo de cultura, demonstrando assim a viabilidade das células, que se encontram em proliferação (Fernandes-Silva e col., 2013).

3.3. *Scaffolds* para liofilização

Em engenharia de tecidos, são utilizados diferentes materiais e tecnologias para a produção de estruturas porosas com uma gama alargada de propriedades, procurando atender aos requisitos específicos da aplicação em vista. Uma das tecnologias usadas com frequência para a produção de biomateriais porosos é a técnica de liofilização. Para utilizar esta técnica, prepara-se uma solução polimérica com uma dada concentração, que é congelada em moldes com a dimensão e forma desejadas, consoante a aplicação pretendida. Congelar a solução origina a formação de cristais de gelo que, por sublimação durante o processo de liofilização, darão origem à porosidade da estrutura. Estes cristais de gelo serão tanto menores quanto mais rápido for o processo de congelação (Reys e col., 2013). Na preparação de estruturas porosas para aplicação em engenharia de tecidos e medicina regenerativa é essencial a existência de porosidade na estrutura, com poros de dimensão adequada à proliferação celular, e elevada interconectividade entre os poros, que permita a migração celular para o interior da estrutura, bem como o respetivo fluxo de nutrientes, oxigénio e produtos de excreção (Hutmacher, 2001).

O colagénio é um dos polímeros mais utilizados em engenharia de tecidos sendo, nessa perspetiva, importante elucidar a aplicação desta técnica de preparação de biomateriais, através de alguns exemplos de utilização de colagénio marinho.

Num trabalho recente, Moreira-Silva e colegas solubilizaram colagénio previamente extraído a partir de peles do tubarão *Scyliorhinus canícula* (isolado como descrito por Fernandes-Silva e colegas (Fernandes-Silva e col., 2013)) em ácido acético 0'5 M a uma concentração de 4% e promoveram a sua reticulação *in situ* na presença de genipina 10 mM, durante 2 horas. Esta solução foi colocada em placas de 96 poços, congelada a -80 °C e liofilizada, obtendo-se estruturas porosas estáveis. Por forma a avaliar a sua possível utilização na regeneração da cartilagem, estas estruturas foram caracterizadas utilizando diferentes técnicas. Foi realizada uma Análise Mecânica Dinâmica (DMA) às estruturas húmidas, em PBS a 37 °C, sendo que em frequências mais elevadas o material demonstrou boas propriedades de amortecimento, sugerindo bom comportamento viscoelástico. A capacidade das estruturas reticuladas de reterem água foi também avaliada em PBS (a pH 7'4 e 37 °C), mostrando que

estas são capazes de reter até 7 vezes a sua massa inicial. A caracterização morfológica das estruturas foi feita através de SEM e μ -CT, apresentando um tamanho de poro entre 150 e 200 μm , com uma porosidade total de 66% (Figura 10). A proliferação celular foi também avaliada com células ATDC5, sendo possível observar um aumento da quantidade de dsDNA em função do tempo de cultura, demonstrando assim a ocorrência de proliferação celular, o que é suportado pelas observações feitas através de SEM ao longo dos dias de cultura (Figura 11).

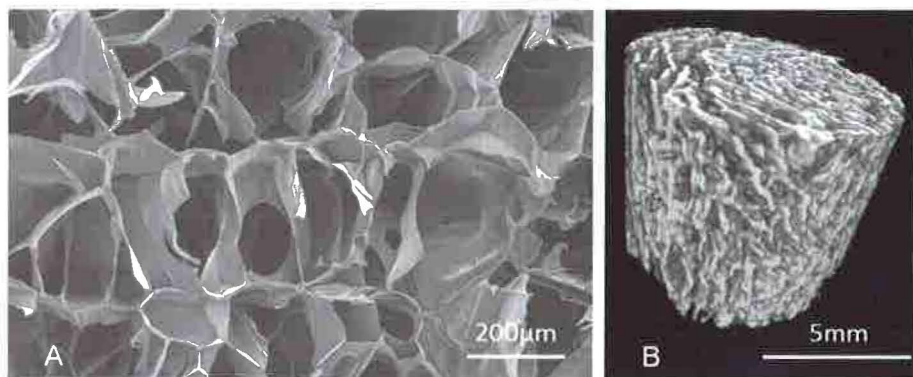


Figura 10. A) Imagem de SEM e B) μ -CT de estruturas porosas de colagénio marinho reticuladas com genipina e produzidas por liofilização.

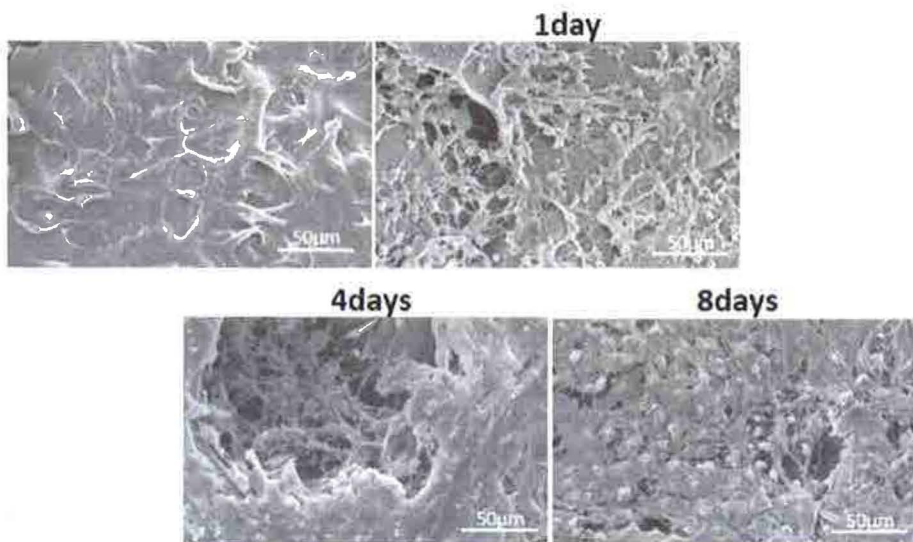


Figura 11. Imagens de SEM de células ATDC5 cultivadas em estruturas de colagénio marinho reticuladas com genipina, obtidas ao longo de oito dias de cultura celular.



Estruturas porosas podem ser produzidas utilizando colagénio marinho, como referido no exemplo anterior, mas estas podem também ser obtidas a partir da combinação de 2 ou mais polímeros naturais de origem marinha. Neste sentido, para a regeneração da mucosa oral, Terada e colegas produziram estruturas porosas através da mistura de quitosano e colagénio marinho isolado de escamas de tilápia (Terada e col., 2012). Estas estruturas foram preparadas por liofilização: a uma mistura de quitosano:colagénio (v/v) de iguais volumes de solução de quitosano (0'8%, w/v) e colagénio (1%, w/v) foi adicionado carbonato de sódio com hidrogenocarbonato de sódio (30 mmol/L), sendo esta solução colocada em moldes de forma a gelificar com a morfologia adequada. Após desidratação com etanol e liofilização, seguidos por um tratamento desidrotérmico (130 °C, a baixa pressão, durante 24h), obtiveram-se estruturas porosas com propriedades mecânicas e porosidade adequadas à aplicação na regeneração da mucosa oral.

3.4. Compósitos com hidroxiapatite

3.4.1. Biomateriais baseados em fosfatos de cálcio

A importância dos fosfatos de cálcio na área da medicina regenerativa, particularmente nas aplicações na medicina ortopédica, dentária e cirurgia traumática, tem justificado o elevado número de estudos científicos e consequentes publicações.

Na natureza existem diversas formas de fosfatos de cálcio com diferentes fins, dependendo das suas propriedades (Tabela 1). No entanto, apesar das diversas aplicações que os fosfatos de cálcio podem assumir, existe um especial interesse em estudar as suas aplicações na regeneração de tecidos duros, incluindo cicatrização de defeitos ósseos, tratamento de fraturas, aumento ósseo, reconstrução crânio-maxilo-facial, coluna vertebral, otorrinolaringologia, oftalmologia, assim como para o desenvolvimento de produtos para fins dentários e periodontais (Dorozhkin, 2013).

O osso é um tecido metabolicamente ativo constituído por água, células e matriz óssea, responsável pelo suporte de todo o corpo. A matriz óssea é composta por uma parte orgânica (35%) constituída maioritariamente por colagénio e proteoglicanos e uma parte inorgânica (65%) constituída

maioritariamente por cristais de fosfatos de cálcio, especificamente hidroxiapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Ambas as partes, orgânica e inorgânica, são importantes para manter a flexibilidade e resistência à compressão, respetivamente (Seeley e col., 2008). No entanto, uma ampla gama de lesões pode levar à perda das funcionalidades deste tecido.

Tabela 1. Fosfatos de cálcio de acordo com rácio entre Ca:P (Vallet-Regí, 2001, Akram e col., 2014).

Designação	Abreviatura	Fórmula Química	Rácio Ca:P
Fosfato tetracálcico	PTCa	$Ca_4O(PO_4)_2$	2'0
Hidroxiapatite	HA	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1'67
Fluoroapatite	FP	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$	1'67
Fosfato tricálcico (α, β, γ)	FTCa	$Ca_3(PO_4)_2$	1'50
Fosfato octacálcico	FOCa	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	1'33
Hidrogenofosfato de cálcio dihidratado	FDCaDH	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	1'0
Hidrogenofosfato de cálcio	FDCa	$CaHPO_4$	1'0
Pirofosfato de cálcio	FCa	$Ca_2P_2O_7$	1'0
Pirofosfato de cálcio dihidratado	PFCaDH	$Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$	1'0
Fosfato heptacálcico	FCaHP	$Ca_7(P_5O_{16})_2$	0'7
dihidrogenofosfato tetracálcico	FTCaDA	$Ca_4H_2P_6O_{20}$	0'67
Dihidrogenofosfato de cálcio monohidratado	FCaMH	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	0'5
Metafosfato de cálcio (α, β, γ)	MFCa	$Ca(PO_3)_2$	0'5

Neste contexto, a hidroxiapatite surge como um dos fosfatos de cálcio mais estudados e procurados para este tipo de lesões. A escolha da hidroxiapatite como biomaterial para aplicações biomédicas deve-se não só à referida semelhança com a composição nativa do tecido ósseo, mas também às suas excelentes propriedades de biocompatibilidade, osteocondutividade e osteointegração, promovendo a adesão e

proliferação celular (Vallet-Regí, 2001). No entanto, apesar das excelentes propriedades biológicas, a hidroxiapatite apresenta fracas propriedades mecânicas, que podem variar dependendo da sua origem.

A hidroxiapatite pode ser sintetizada ou extraída de diversas fontes, desde ossos de mamíferos, espinhas de peixe, plantas, entre outros (Akram e col., 2014). Contudo, o método de extração e a respetiva eficiência vão depender da fonte, da acessibilidade dos fosfatos de cálcio nessa fonte, bem como o seu teor mineral (Akram e col., 2014). Também o método de extração utilizado vai afetar as suas propriedades, como o tamanho de partícula, morfologia, estequiometria, estabilidade térmica e presença de iões. Enquanto a hidroxiapatite do osso nativo, bem como a hidroxiapatite obtida a partir de mamíferos e alguns compostos marinhos já testados não é estequiométrica, devido à presença de determinados iões (como magnésio, silício ou outros), a hidroxiapatite sintética é estequiométrica. Além disso, a hidroxiapatite obtida a partir de mamíferos ou peixes apresenta um perfil mais puro ao contrário da obtida a partir de recursos biogénicos ou plantas, que são mais instáveis, devido ao processo incompleto de conversão dos precursores da hidroxiapatite (Akram e col., 2014). Deste modo, as fontes marinhas têm-se tornado excelentes candidatos para a extração de hidroxiapatite, já que embora ainda que existam algumas limitações e diferenças consoante a sua origem, os resultados obtidos até ao momento com os diversos fosfatos de cálcio são bastantes promissores, como são exemplo disso, aliás, outros capítulos deste livro.

3.4.2. Aplicações

A hidroxiapatite está disponível em diversos estados físicos, geralmente em pó, grânulos ou partículas de várias dimensões. É geralmente combinada com outros biomateriais, maioritariamente com polímeros, uma vez que estes conferem propriedades, como a elasticidade, que a hidroxiapatite não tem e que é necessária para a mimetização do tecido a regenerar (Liu e Ma, 2004). Existem vários estudos que combinam hidroxiapatite com diversos polímeros, tais como: gelatina (Chang e col., 2003), quitosano (Ang e col., 2002), colagénio (Wahl e col., 2007), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) (Kim e col., 2007), ácido poliláctico (PLA) (Woo e col., 2007), entre outros, para a produção de diversos biomateriais. Destas combinações resultaram microsferas (Li e col., 2010), membranas (Madhumathi e col.,

2009), nanotubos (Chandanshive e col., 2013), hidrogéis, estruturas tridimensionais (3D) (Wahl e col., 2007) ou até mesmo revestimentos, visando aplicação na regeneração de tecidos (Figura 12).



Figura 12. Esquema ilustrativo da diversidade de aplicações da hidroxiapatite.

Com o objetivo de atender às necessidades do paciente, existe cada vez mais uma exploração intensiva de novas técnicas e métodos de produção. A progressão nas técnicas de fabrico tem promovido o desenvolvimento de estruturas com elevado nível de complexidade. Como fruto da intensa investigação, resultam bastantes produtos atualmente já registados e/ou até mesmo comercializados, que se encontram listados no trabalho de Dorozhkin (2013).

Apesar dos resultados já obtidos com hidroxiapatite serem bastante promissores e uma boa alternativa a muitos materiais, ao que se soma a vasta gama de produtos já disponíveis no mercado, a busca incessante por soluções cada vez mais próximas do que seria ideal leva muitos estudos a introduzir novas fontes naturais para obtenção de hidroxiapatite e outros fosfatos de cálcio.

3.4.3. Fontes marinhas

Fonte marinhas, especificamente resíduos e subprodutos de peixe, têm ganho especial interesse para aplicações biomédicas. Anualmente, uma elevada quantidade de subprodutos marinhos, como espinhas, cabeças, peles, vísceras e caudas são originadas no processamento de peixe, sendo direcionadas fundamentalmente para produção de alimento animal e fertilizantes (Kim e Mendis, 2006, Ferraro e col., 2010). No entanto, estes subprodutos provenientes da indústria pesqueira contêm uma grande quantidade de proteínas estruturais (entre outros compostos), com potencial interesse para diferentes aplicações industriais, particularmente na área da engenharia de tecidos. Deste modo, a extração de compostos a partir de fontes marinhas tem-se tornado cada vez mais alvo de estudo. Geralmente, são utilizadas peles e músculos de peixe para a extração de colagénio e gelatinas e espinhas de peixe para extrair cálcio para incorporação em diferentes produtos dietéticos com destino a organismos com défice nos níveis deste ião. Recentemente, as espinhas têm servido também como tentativa para a extração de fosfatos de cálcio, tendo sido já alcançados resultados consideráveis (Kim e Mendis, 2006). Além disso, a possibilidade de usar a mesma fonte para a extração de diferentes compostos torna-a altamente promissora e valiosa.

Outros capítulos deste livro abordam em detalhe a obtenção de fosfatos de cálcio de recursos marinhos, particularmente de espinhas de peixe, pelo que recomendamos ao leitor interessado em informação adicional a leitura desses capítulos.

3.4.4. Combinação de fosfatos de cálcio e colagénio marinho obtidos a partir da mesma fonte

Para corroborar a importância das espécies marinhas, testou-se a combinação de uma mistura de fosfatos de cálcio extraídos de dente de tubarão *Prionace glauca* com colagénio obtido a partir de pele da mesma fonte, para a produção de estruturas tridimensionais porosas para posterior utilização como suporte à cultura celular, numa ótica de engenharia de tecidos do osso. Os fosfatos de cálcio utilizados apresentam propriedades muito interessantes devido à presença significativa de flúor, correspondendo, ainda que parcialmente, a fluoroapatite.

Para a produção das estruturas solubilizou-se o colagénio (ASC) previamente extraído numa solução de ácido acético e adicionou-se à solução uma determinada quantidade de partículas de fosfatos de cálcio, de forma a obter diferentes formulações, variando o rácio entre as concentrações de fosfatos de cálcio e de ASC. Para reticular a mistura foram utilizados dois agentes de reticulação diferentes: etil(dimetilaminopropil)carbodiimida/ N-hidroxissuccinimida (EDC/NHS) e HMDI. As estruturas foram produzidas pelo método de congelamento seguido por liofilização (Figura 13).



Figura 13. Esquema ilustrativo do processo de produção de estruturas porosas, composto de colagénio e fosfatos de cálcio, para aplicação em engenharia de tecidos.

As estruturas compostas produzidas revelaram-se estáveis e bioativas (Figura 14A), sendo capazes de promover a adesão e a proliferação celular (Figura 14B), tornando-as numa boa aposta para aplicações futuras no que diz respeito à regeneração de tecidos do osso.

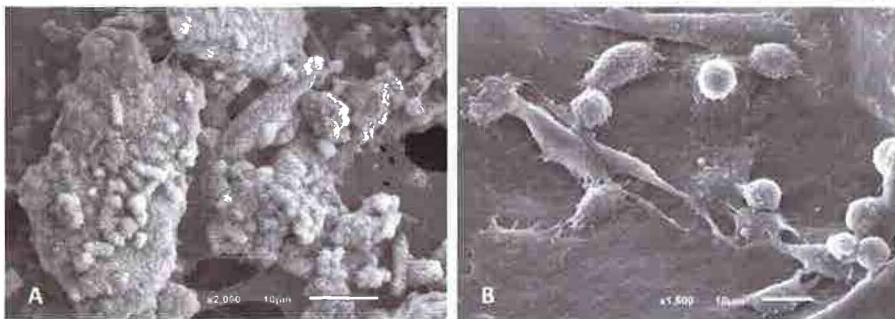


Figura 14. Imagens de SEM ilustrando os ensaios de avaliação de bioactividade e citotoxicidade das estruturas compostas de fosfatos de cálcio e colagénio de tubarão.



4. Considerações finais

O colagénio tem um largo espectro de aplicações em áreas diretamente relacionadas com a saúde, como cosmética, farmacêutica ou cuidados de saúde, e também na indústria alimentar como aditivo ou nutracêutico. Normalmente extraído de fontes bovinas e porcinas, o consumo deste colagénio poderá ter alguns constrangimentos a nível de saúde, como transmissão de doenças (como a BSE, encefalopatia espongiforme bovina, conhecida como doença das vacas loucas) ou devido a crenças religiosas, restringindo assim o consumo ou utilização da proteína obtida destas fontes. Embora dispendiosa, a produção de colagénio através de tecnologia recombinante é uma alternativa, através do uso de leveduras modificadas geneticamente de modo a expressarem a proteína desejada. Contudo é necessária tecnologia avançada e recursos elevados, o que tem limitado significativamente a sua exploração comercial.

Assim, conciliando uma fonte natural, abundante e pouco explorada, os recursos marinhos, nomeadamente as peles de peixes não aproveitadas, tornam-se numa fonte ideal para a extração de colagénio marinho onde este se torna, por sua vez, numa alternativa de grande valor ao colagénio comercializado atualmente. De facto, os colagénios podem ser extraídos de diversas fontes marinhas, como medusas, esponjas marinhas, pepinos-do-mar, cefalópodes e várias espécies de peixes, mas a utilização de um subproduto parece apresentar vantagens adicionais, por corresponder a uma valorização desse subproduto e assim de todo o recurso, contribuindo para uma exploração mais sustentável dos recursos marinhos.

O colagénio obtido de diversas fontes marinhas tem sido também proposto para aplicação biomédica, nomeadamente como membranas, géis e matrizes porosas para engenharia de tecidos (osso, cartilagem, mucosa oral, pele) ou para tratamento da pele, com resultados promissores.

Para que seja possível avançar, é agora fundamental que o volume de resultados cresça e se torne mais sólido, nomeadamente com validação em ensaios em modelos animais e mesmo em ensaios clínicos, que mostrem claramente a eficácia das tecnologias e produtos propostos.

Por outro lado, é também fundamental trabalhar na caracterização e validação do colagénio de fontes marinhas para aplicação na área

farmacêutica e médica, atendendo aos rigorosos e estreitos requisitos que essas áreas apresentam. Nesse aspeto em particular, há limitações críticas atuais para a utilização de subprodutos resultantes do processamento de peixe, que têm a ver com a sua classificação como tal e que impedem a sua utilização para fins humanos, sendo assim necessário ou um trabalho de reenquadramento legal ou de diferente tratamento desses materiais que são, na verdade, matérias-primas muito relevantes.

Do ponto de vista comercial, há ainda que contar com os concorrentes já estabelecidos, de origem bovina e porcina. Apesar das limitações referidas atrás, a sua produção dentro de rigoroso controlo de qualidade e direcionando-os para mercados apropriados, constituem produtos de excelente qualidade e assim barreiras naturais à entrada no mercado de outros produtos que não apresentem nenhuma característica fortemente diferenciadora.

Perspetiva-se assim um horizonte de vários anos até à entrada no mercado de biomateriais à base de colagénio marinho, mas tanto os cientistas como os médicos e farmacêuticos estão a trabalhar afincadamente para que isso seja uma realidade. E os pacientes precisam que essas soluções terapêuticas apareçam.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro do FEDER através do Programa Operacional de Cooperação Transfronteiriça Espanha Portugal 2007-2013 (POCTEP) no âmbito do projeto 0687_NOVOMAR_1_P. O apoio financeiro do Sétimo Programa Quadro de Investigação e Desenvolvimento da União Europeia, no âmbito do projeto REGPOT-CT2012-316331-POLARIS, e da Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito da bolsa de pós-doutoramento de JMS é também agradecido.

Referências bibliográficas

- Regulamento (UE) nº 1380. Jornal Oficial da União Europeia, Luxemburgo, 28 de dezembro de 2013.
- Akram M., Ahmed R., Shakir I., Ibrahim W. A. W., Hussain R. (2014) Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources. *Journal of Materials Science*, 49: 1461-1475.

- Ang T., Sultana F., Hutmacher D., Wong Y. S., Fuh J. e col. (2002) Fabrication of 3D chitosan-hydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system. *Materials Science and Engineering C*, 20: 35-42.
- Badii F., Howell N. K. (2003) Elucidation of the effect of formaldehyde and lipids on frozen stored cod collagen by FT-Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1440-1446.
- Bailey A. J., Paul R. G., Knott L. (1998) Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of Ageing and Development*, 106: 1-56.
- Benjakul S., Nalinanon S., Shahidi F. (2012) Fish collagen. Em: *Food biochemistry and food processing*, Simpson B. K. (ed.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido. 365-387 p.
- Benjakul S., Thiansilakul Y., Visessanguan W., Roytrakul S., Kishimura H. e col. (2010) Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 132-138.
- Chandanshive B. B., Rai P., Rossi A. L., Ersen O., Khushalani D. (2013) Synthesis of hydroxyapatite nanotubes for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, 33: 2981-2986.
- Chang M. C., Ko C. C., Douglas W. H. (2003) Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. *Biomaterials*, 24: 2853-2862.
- Chasin M., Langer R. (1990) *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. Marcel Dekker, Nova Iorque, EUA. 347 p.
- Dorozhkin S. V. (2013) Calcium orthophosphate-based bioceramics. *Materials*, 6: 3840-3942.
- Fernandes-Silva S., Moreira-Silva J., Silva T. H., Perez-Martin R. I., Sotelo C. G. e col. (2013) Porous hydrogels from shark skin collagen crosslinked under dense carbon dioxide atmosphere. *Macromolecular Bioscience*, 13: 1621-1631.
- Ferraro V., Cruz I. B., Jorge R. F., Malcata F. X., Pintado M. E. e col. (2010) Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: a review. *Food Research International*, 43: 2221-2233.
- Foegeding E. A., Lanier T. C., Hultin H. O. (1996) Collagen. Em: *Food chemistry*, Fennema O. R. (ed.). Marcel Dekker Inc., New York, EUA. 902-906 p.
- Gómez-Guillén M. C., Giménez B., López-Caballero M. E., Montero M. P. (2011) Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review. *Food Hydrocolloids*, 25: 1813-1827.
- Gómez-Guillén M. C., Turnay J., Fernández-Díaz M. D., Ulmo N., Lizarbe M. A. e col. (2002) Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16: 25-34.
- Hashim P., Mohd-Ridzwan M. S., Bakar J., Mat-Hashim D. (2015) Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal*, 22: 1-8.
- Horng J. C., Kotch F. W. e Raines R. T. (2007) Is glycine a surrogate for a D-amino acid in the collagen triple helix? *Protein Science* 16: 208-215.

- Hoyer B., Bernhardt A., Heinemann S., Stachel I., Meyer M. e col. (2012) Biomimetically mineralized salmon collagen scaffolds for application in bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 13: 1059-1066.
- Hutmacher D. W. (2001) Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 12: 107-124.
- Hwang J. H., Mizuta S., Yokoyama Y., Yoshinaka R. (2007) Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja kenojei*). *Food Chemistry*, 100: 921-925.
- Jongjareonrak A., Rawdkuen S., Chaijan M., Benjakul S., Osako K. e col. (2010) Chemical compositions and characterisation of skin gelatin from farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*). *LWT - Food Science and Technology*, 43: 161-165.
- Kim S. K., Mendis E. (2006) Bioactive compounds from marine processing byproducts – a review. *Food Research International*, 39: 383-393.
- Kim S. S., Ahn K. M., Park M. S., Lee J. H., Choi C. Y. e col. (2007) A poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced osteoconductivity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80: 206-215.
- Kittiphattanabawon P., Benjakul S., Visessanguan W., Nagai T., Tanaka M. (2005) Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 89: 363-372.
- Kittiphattanabawon P., Benjakul S., Visessanguan W., Shahidi F. (2010a) Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *LWT-Food Science and Technology*, 43: 792-800.
- Kittiphattanabawon P., Benjakul S., Visessanguan W., Shahidi F. (2010b) Isolation and properties of acid- and pepsin-soluble collagen from the skin of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *European Food Research and Technology*, 230: 475-483.
- Li G. Y., Fukunaga S., Takenouchi K., Nakamura F. (2005) Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials. *International Journal of Cosmetic Science*, 27: 101-106.
- Li L., Kommareddy K., Pilz C., Zhou C., Fratzl P. e col. (2010) In vitro bioactivity of bioresorbable porous polymeric scaffolds incorporating hydroxyapatite microspheres. *Acta Biomaterialia*, 6: 2525-2531.
- Liu D., Liang L., Regenstein J. M., Zhou P. (2012) Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*, 133: 1441-1448.
- Liu X., Ma P. X. (2004) Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 32: 477-486.
- Lynn A. K., Yannas I. V., Bonfield W. (2004) Antigenicity and immunogenicity of collagen. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 71: 343-354.



- Madhumathi K., Shalumon K., Rani V. D., Tamura H., Furuike T. e col. (2009) Wet chemical synthesis of chitosan hydrogel-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45: 12-15.
- Matmaroh K., Benjakul S., Prodpran T., Encarnacion A. B., Kishimura H. (2011) Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*, 129: 1179-1186.
- Nagai N., Yunoki S., Suzuki T., Sakata M., Tajima K. e col. (2004) Application of cross-linked salmon atelocollagen to the scaffold of human periodontal ligament cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97: 389-394.
- Nagai T., Araki Y., Suzuki N. (2002) Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). *Food Chemistry*, 78: 173-177.
- Nagai T., Suzuki N. (2000) Isolation of collagen from fish waste material - skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68: 277-281.
- Nalinanon S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H. (2007) Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 104: 593-601.
- Nam K. A., You S. G., Kim S. M. (2008) Molecular and physical characteristics of squid (*Todarodes pacificus*) skin collagens and biological properties of their enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Science*, 73: C249-255.
- Ranade V. V., Hollinger M. A., Cannon J. B. (2003) Drug delivery systems. Boca Ratón, Florida, EUA, CRC Press. 464 p.
- Regenstein J. M., Zhou P. (2006) Collagen and gelatin from marine by-products. Em: Maximising the value of marine by-products, Shahidi F. (ed.). Woodhead Publishing. 279-303 p.
- Reys L. L., Silva S. S., Oliveira J. M., Caridade S. G., Mano J. F. e col. (2013) Revealing the potential of squid chitosan-based structures for biomedical applications. *Biomedical Materials*, 8: 045002.
- Ricard-Blum S. (2011) The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3: a004978.
- Sadowska M., Kolodziejaska I., Niecikowska C. (2003) Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 81: 257-262.
- Seeley R. R., Stephens T. D., Tate P. (2008) Anatomia & Fisiologia. Lusociência-Edições Técnicas e Científicas, Lda. 1280 p.
- Senaratne L. S., Park P. J., Kim S. K. (2006) Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technology*, 97: 191-197.
- Shigeru K., Masataka S. (1999) Characterization of fish type I collagen. Em: Extracellular matrix of fish and shellfish, Sato K., Sakaguchi M., Bremner H. A. (eds.). Research Signpost, India. 1-13 p.

- Sikorski Z. E. (1994) The Contents of proteins and other nitrogenous compounds in marine animals. Em: Seafood proteins, Sikorski Z. E., Pan B. S., Shahidi F. (eds.). Springer, US. 6-12 p.
- Singh P., Benjakul S., Maqsood S., Kishimura H. (2011) Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Food Chemistry, 124: 97-105.
- Slaughter B. V., Khurshid S. S., Fisher O. Z., Khademhosseini A., Peppas N. A. (2009) Hydrogels in regenerative medicine. Advanced Materials, 21: 3307-3329.
- Song E., Kim S. Y., Chun T., Byun H. J., Lee Y. M. (2006) Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. Biomaterials, 27: 2951-2961.
- Sotelo C. G., Blanco M., Ramos Ariza P., Pérez-Martín R. (2015) Characterization of collagen from different discarded fish species of the West coast of the Iberian Peninsula. Journal of Aquatic Food Product Technology. *Submetido*.
- Terada M., Izumi K., Ohnuki H., Saito T., Kato H. e col. (2012) Construction and characterization of a tissue-engineered oral mucosa equivalent based on a chitosan-fish scale collagen composite. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 100: 1792-1802.
- Uchegbu I. F., Schatzlein A. G. (2006) Polymers in drug delivery. CRC Press. 280 p.
- Vallet-Regí M. (2001) Ceramics for medical applications. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions. 97-108.
- Wahl D. A., Sachlos E., Liu C., Czernuszka J. T. (2007) Controlling the processing of collagen-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 18: 201-209.
- Wang L., An X., Xin Z., Zhao L., Hu Q. (2007) Isolation and characterization of collagen from the skin of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). Journal of Food Science, 72: E450-455.
- Woo K. M., Seo J., Zhang R., Ma P. X. (2007) Suppression of apoptosis by enhanced protein adsorption on polymer/hydroxyapatite composite scaffolds. Biomaterials, 28: 2622-2630.
- Zelechowska E., Sadowska M., Turk M. (2010) Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Hydrocolloids, 24: 325-329.
- Zhang M., Liu W., Li G. (2009) Isolation and characterisation of collagens from the skin of largemouth longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). Food Chemistry, 115: 826-831.